LABORATORIO NEURO-PATOLOGICO DEL R. MANICOMIO DI COLLEGNO

MODIFICAZIONI AL METODO DI GOLGI

PER LO STUDIO DI ALCUNE PARTICOLARITÀ

DELLA

GUAINA MIDOLLARE

DELLE

FIBRE NERVOSE PERIFERICHE

Nota di tecnica microscopica

pel Dottor **BATTISTA PELLIZZI**

TORINO, 1894
TIPOGRAFIA SPANDRE E LAZZARI
Via Mazzini, 40.

LABORATORIO NEURO-PATOLOGICO DEL R. MANICOMIO DI COLLEGNO

MODIFICAZIONI AL METODO DI GOLGI

PER LO STUDIO DI ALCUNE PARTICOLARITÀ

DELLA

GUAINA MIDOLLARE

DELLE

FIBRE NERVOSE PERIFERICHE

Nota di tecnica microscopica

pel Dottor **BATTISTA PELLIZZI**

TORINO, 1894

TIPOGRAFIA SPANDRE E LAZZARI

Via Mazzini, 40.

TIPOGRAFIA GIANDRE E LAZZARI
TORINO 1894

per Dottor BATTISTA PERLIZZI

FIBRE NERVOSE PERIFERICHE

DELLE

CAVIA MIDOLLARE

DELLA

PER LO STUDIO DI ALCUNE PARTICOLARITÀ

MODIFICAZIONI AL METODO DI GOLGI

LABORATORIO NEURO-PATOLOGICO DEL R. MANICOMIO DI COLLEGNO

LABORATORIO NEURO-PATOLOGICO DEL R. MANICOMIO DI COLLEGNO

MODIFICAZIONI AL METODO DI GOLGI

PER LO STUDIO DI ALCUNE PARTICOLARITÀ

DELLA GUAINA MIDOLLARE

DELLE FIBRE NERVOSE PERIFERICHE

Nota di tecnica microscopica

pel Dottor G. B. PELLIZZI

Le recenti ricerche fatte da Golgi e dai suoi allievi sopra le fibre nervose sono state oggetto in questi ultimi tempi di grande interesse e di molta discussione. La non lieve difficoltà di ottenere quelle finissime particolarità di struttura descritte e riprodotte in figure dalla scuola di Golgi, è stata certamente l'unica causa per la quale da alcuni è stata posta in dubbio la reale esistenza di dette particolarità.

Köllicker, nell'ultima edizione del suo trattato d'istologia, dopo averli minutamente riferiti, non esita a ritenere tutti i risultati ottenuti da Golgi, Rezzonico, Cattani, Marenghi e Villa, Schieffferdecker, come prodotti artificiali, non rispondenti a nessuna immagine e condizione naturale, ma determinati dai diversi modi di trattamento delle fibre nervose. Aggiunge poi di non essere mai riuscito ad ottenere imbuti così regolari, quali li ha disegnati Rezzonico.

Dietro consiglio del prof. Bizzozero, mi applicai, già da parecchio tempo, in collaborazione col Dott. Tirelli, allo studio della guaina midollare delle fibre nervose. Si cercò anzitutto di ottenere coi metodi indicati da Golgi le immagini già ottenute da Golgi stesso, Rezzonico, Fusari e Monti, Marenghi e

Villa, ma si incontrarono subito non lievi difficoltà. I metodi, sia il lento che il rapido, usati dagli autori citati, sono piuttosto incostanti e quasi sempre parziali. Spesso non solo alcuni dei passaggi dal bicromato in nitrato d'argento, ma anche delle intiere prese di nervi (dall'animale appena ucciso), dànno risultato completamente negativo. Non è con molta frequenza che si riesce ad ottenere la reazione in modo molto dimostrativo. Questo naturalmente io affermo, basandomi esclusivamente sulla mia esperienza fatta su non meno di 20 prese di materiale, con 10 a 15 passaggi in nitrato d'argento per ciascuna.

I risultati ottenuti coi detti metodi bastarono però a farmi pienamente convinto che le spirali cornee descritte dal Golgi rappresentano realmente una particolarità istologica naturale e fisiologica della guaina midollare. Pensai quindi che un liquido nutritivo qualsiasi, il quale avesse potuto meglio e più a lungo conservare la fibra nervosa in condizioni più vicine al normale, avrebbe dovuto dare migliori effetti. Ricorsi senz'altro ai mezzi liquidi di nutrizione comunemente usati in batteriologia, ed ottenni subito bellissimi risultati. Usai il brodo per la comodità che offre sia per ottenerlo che per conservarlo.

Io preparo il liquido, nel quale immergo nervi tolti dall'animale appena ucciso, sciogliendo nel brodo, nella proporzione del 2 0|0, il bicromato di potassa. Da questo liquido faccio i passaggi, come consiglia Golgi, nella soluzione di nitrato d'argento al 0,50 0|0.

Colla detta soluzione brodosa di bicromato, senza aggiunta di acido osmico, ho sempre ottenuti, specialmente nella stagione estiva, buoni preparati con numerosi imbuti completi e molti incompleti. Questi si veggono subito, a differenza della semplice soluzione acquosa di bicromato di potassa, appena il preparato è montato. In seguito scompaiono rapidamente (in poche ore) per ricomparire però, molte volte, dopo che il preparato ha subìto lungamente, come consiglia Rezzonico, l'azione dei raggi solari.

Naturalmente volli subito vedere se il brodo agiva veramente come mezzo nutritivo del tesstuo o per la presenza di qualcuno dei suoi componenti. Feci allora delle prese di nervi mettendone in diverse soluzioni di bicromato di potassa nella solita proporzione del due per cento, fatte o nel semplice estratto di carne, o in

acqua, alla quale aveva aggiunto rispettivamente o cloruro di sodio al 0,5 0[0, o peptone all'1 0[0, o bicarbonato di soda, o pepsina, ma non ottenni mai nessun risultato positivo. Usai poi invece del brodo lo siero di sangue, ed in numerose prove, fatte insieme al Dott. Tirelli, ottenni risultati identici a quelli ottenuti col brodo. Ebbi così una controprova sicura, che valse a confermare la ipotesi da me fatta *a priori* che mi aveva condotto all'applicazione del brodo.

Aggiungendo alla sopradetta soluzione di bicromato in brodo da 20 a 40 goccie per cento di una soluzione di acido osmico all'1 per cento, si ottengono preparati assai migliori nei quali *la reazione è completamente riuscita in tutte le fibre*. Mi affretto però ad aggiungere che *la reazione veramente completa non è costante*, mentre invece *è costante* la reazione parziale, la quale, per quanto parziale, mi pare sempre migliore di quanto si possa ottenere con qualsiasi altro metodo fino ad ora a me noto.

Dopo 6 ore di immersione di un nervo ischiatico (gatto, cane, coniglio, ratto) nella soluzione brodosa di bicromato, il passaggio in nitrato d'argento dà già qualche buon risultato, ma i migliori preparati si hanno nella stagione estiva, dopo 12-24 ore di permanenza del nervo nella soluzione brodosa, nella stagione invernale dopo 3-4 e anche 5 giorni; la durata dell'azione del nitrato d'argento deve essere dalle 6 alle 12-18 ore; un'azione più lunga l'ho trovata dannosa. I preparati fatti con questo metodo si alterano rapidamente dopo 2-6 ore in estate, 12-24 in inverno; conservati al buio perfetto resistono per 2-4 giorni. Quasi sempre però dopo che il preparato è rimasto per 15-20 giorni alla luce e al calore solare, ritornano completamente le immagini degli imbuti. I preparati resistono allora inalterati per circa due mesi, poi vanno lentamente alterandosi fino a perdere ogni pregio.

Presentemente, nella stagione invernale, ho trovato che, per ottenere buonissimi risultati, bisogna aumentare la proporzione dell'acido osmico fino a 10 cent. cubi di soluzione di questo acido all'1 0[0 per 100 cmc., di soluzione brodosa di bicromato. I migliori preparati si hanno dai passaggi fatti nella 3ª o 4ª giornata, e dopo 6-12 ore che ha agito il nitrato d'argento.

Con i metodi precedentemente indicati, per quanto rappresentino,

secondo me, un sicuro e reale miglioramento nella tecnica, non sono però mai riuscito ad ottenere alcune delle particolarità descritte da Golgi, quali, ad esempio, i segmenti cilindro-conici. Cercai allora di aumentare l'azione del nitrato d'argento mediante l'acido picrico. Vassale ha già praticato, ottenendo ottimi risultati, specialmente nei pezzi di corteccia cerebrale da non molto tempo induriti in liquido di Müller, l'aggiunta di acido picrico alla soluzione di nitrato d'argento per la colorazione nera di Golgi.

Io ho preparati i liquidi in questo modo:

Soluzione brodosa di bicromato al 2 0|0 cmc. 100;

Soluzione di acido osmico all'1 0|0 da 5 a 10 cmc.;

Soluzione satura in acqua distillata di acido picrico da 20 a 30 goccie.

Lascio in questo liquido i nervi tanto tempo come coi metodi già indicati, poscia faccio i passaggi in soluzione al 0,50 0|0 di nitrato d'argento, alla quale ho aggiunto tanto acido picrico finchè abbia, in un vetro da orologio, una tinta leggermente paglierina.

Con questo metodo ho avuta la reazione costante, ma parziale; nei punti però dove è riuscita, ho potuto osservare alcune particolarità, non viste prima cogli altri metodi, quali un sistema di fibrille, a reazione identica a quella delle spirali di Golgi, decorrenti in senso longitudinale, circa a ugual distanza dal cilindrasse e dalla guaina di Schwann, solo interrotti dagli strozzamenti di Ranvier. Ma di questo e di tutto quanto riguarda la parte istologica si tratterà in altro lavoro.

I metodi che ho sopra esposti sono tutti di facile esecuzione. Per l'allestimento dei preparati ho sempre usato il metodo suggerito da Golgi. Un piccolo fascetto di fibre si prende dal bagno di nitrato d'argento, si lava ripetutamente in acqua distillata, poi si dissocia in alcool comune, si disidrata, si rischiara in trementina, poi si include in damar, o meglio, in olio di cedro.

La lunga pratica insegna poi tante piccole modalità che contribuiscono alla buona riuscita dei preparati.

Fra le principali noto le seguenti:

1° I nervi debbono essere presi da animali appena uccisi. Debbono essere messi in abbondante quantità di liquido; per un nervo ischiatico di cane, gatto, coniglio adulto, da 30 a 40 cmc.

2° I passaggi in nitrato d'argento si possono cominciare, in estate, 2-4 ore dopo l'immersione nella soluzione brodosa di bicromato e farne 4 o 5 nella giornata, ogni 2 o 3 ore ; d'inverno i passaggi si incomincieranno dopo 24 ore e basterà farne due per giorno.

3° Prima di immergere i pezzetti di nervi in nitrato d'argento bisogna levare completamente il perinevrio, fare una grossolana dissociazione, se il nervo è un po' grosso (ischiatico di cane, di gatto, di coniglio adulto), e poscia una abbondante lavatura in acqua distillata; il lavaggio sarà tanto più prolungato, quanto più duratura è stata l'azione del bicromato.

4° Per fare preparati bisogna rifiutare le fibre più esterne che hanno subita l'azione diretta del nitrato d'argento, perchè su di esse vi è spesso qualche precipitato grossolano. E nei casi in cui si è usato molto acido osmico, non si debbono prendere le fibre più esterne molto annerite, poichè in queste la reazione non avviene bene, ma le più interne che hanno subìto modicamente l'azione dell'acido osmico.

5° In generale si può dire che la reazione avviene bene in quei pezzi di nervi, i quali, immersi nella soluzione di nitrato d'argento, vanno lentamente, nello spazio di parecchi minuti, ricoprendosi di un precipitato finissimamente polverulento, per nulla risplendente, di un colore rosso-mattone un po' sbiadito, leggermente tendente all'aranciato; le fibre interne prendono lo stesso colore, ma un po' più intenso, e appaiono ben terse, non ricoperte da alcun precipitato.

6° La reazione avviene meglio se l'acido osmico che si aggiunge è in soluzione molto concentrata. Se ne aggiungeranno naturalmente tante goccie, proporzionatamente alla concentrazione della soluzione usata, rispondente alle quantità indicate sopra per la soluzione all'1 0[0, quella che più facilmente si trova nei laboratorî.

***

Non ho poi tralasciato di fare tentativi per riuscire a fissare subito, appena ottenute, le immagini, così rapidamente evanescenti, degli imbuti e delle altre particolarità accennate sopra.

Espongo qui soltanto i metodi che mi hanno dato migliori risultati:

1° Applicazione dei mezzi comunemente usati in fotografia per sviluppare e fissare le negative.

Un piccolo fascetto di fibre si leva dal bagno di nitrato d'argento, si dissocia finamente, poi viene immerso per pochi secondi nel liquido che serve in fotografia come bagno sviluppatore (1° Solfato di ferro 30 grammi, acido tartarico 0,5 gr., acqua 100 gr. - 2° Ossalato neutro di potassa 30 gr., acqua 100 gr. - Una parte del primo e tre parti del secondo). Dopo lavatura in acqua si immergono le fibre in una soluzione all'1 0[0 di iposolfito di soda, finchè abbiano perduta la colorazione intensamente nera presa nel bagno precedente. Nuova lavatura in acqua, poi trattamento come gli altri preparati. Con questo metodo la fibra nervosa resta incolore, le spirali restano colorate intensamente in nero e resistono moltissimo anche all'azione dei raggi solari.

2° Bollitura in trementina. — Quando le fibre già dissociate sono a rischiararsi in trementina, si riscaldano in questo liquido sulla lampada ad alcool, finchè dal fondo del vaso si sollevino, con una certa violenza, numerose bolle d'aria. Con questo metodo le fibre prendono un colore giallo intenso, e le spirali cornee diventano brune come nei preparati esposti alla luce e al calore solare.

3° Riduzione del precipitato di cromato d'argento mediante il ferro-cianuro di potassio. — Un fascetto di fibre tolte dal nitrato d'argento viene immerso, dopo dissociazione, in una soluzione di ferro-cianuro di potassio in acqua distillata all'1 0[0. Si levano quando le fibre hanno completamente perduto il colore rossastro dato dal nitrato d'argento. Dopo si fa il solito trattamento. Con questo metodo restano perfettamente scolorate tanto le fibre nervose che le spirali. Queste appaiono allora come tante striature più o meno rifrangenti la luce, secondo che si aumenta o diminuisce la distanza focale.

Se si fa precedere al bagno di ferro-cianuro l'immersione per pochi secondi nel bagno di solfato di ferro e ossalato neutro di potassa del metodo 1°, la fibra nervosa prende una colorazione azzurra. Le spirali di Golgi resistono alla luce e rimangono incolori per circa un mese, poscia vi si riprecipita sopra il cromato d'argento e la fibra prende la solita colorazione gialla.

Per ottenere buoni risultati da questi metodi bisogna che precedentemente la reazione delle spirali sia riuscita perfettamente, vale a dire esse si presentino con linee nette, diritte ed intere, non interrotte o rattratte. Occorre poi che non sieno nelle fibre scelte molti precipitati, e per questo si prenderanno sempre le fibre più interne.

Debbo però qui avvertire che anche i preparati ottenuti con questi metodi, nello spazio di 2 a 4 mesi, si alterano, come tutti gli altri, fino a perdere ogni valore dimostrativo.

***

L'applicazione dei metodi che ho riferiti in questa comunicazione, alle fibre del midollo spinale e in parte anche ai centri nervosi, non ho ancora avuto tempo di praticarla estesamente; lo farò in seguito: posso però dire fin d'ora che le prove già fatte mi hanno dato buoni risultati.

Mi sento ora in dovere di ringraziare quì il Dott. V. Tirelli, direttore di questo laboratorio neuro-patologico, per il valido aiuto prestatomi specialmente per quanto riguarda l'applicazione dello siero e la determinazione quantitativa dell'acido osmico necessario per la migliore riuscita della reazione, ed anche per avere controllati i miei risultati, usando sempre, per le ricerche istologiche che egli ha ora in corso in collaborazione con me, i metodi sopra esposti.

Estratto dagli *Annali di Freniatria e Scienze affini*
del R. Manicomio di Torino